基因改造 *ipt* (isopentenyl transferase)青花菜葉表與土壤微生物相之研究

丁柏瑜 [1]、陳涵葳 [2]、陳烈夫 [3]、杜元凱 [2]*

[1] 朝陽科技大學生化科技研究所
[2] 行政院農業委員會農業試驗所生物技術組
[3] 行政院農業委員會農業試驗所技術服務組

摘要

有鑑於基因改造技術的快速發展，釐清基改植物對環境安全之影響殊有必要。本研究以基改異戊烯轉移酶 (isopentenyl transferase; *ipt*) 基因之青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*)為對象，探討基改與非基改青花菜對環境微生物群落之影響，參試青花菜品種(系)包括基改 *ipt* 青花菜「綠王」自交系(103 轉殖系)、作為對照組未轉殖的自交系(104 自交系)、以及商用一代雜交「綠王」品種。基改 *ipt* 青花菜之土壤 pH 為 7.2–7.7，相較對照組土壤 pH 值 7.0–7.7，兩者無顯著差異；定植當天基改 *ipt* 青花菜根圈土壤有機質含量較高，但定植後 90 d 各品系間土壤有機質含量在 1.52–1.96%間，差異不顯著。對照組 104 自交系葉表面總真菌數在 2010 年顯著較高，同一年度葉表面之總細菌雖高於其他品系，但差異未達顯著水準。利用選擇性培養基評估土壤指標性微生物族群數目之消長，大部分微生物族群含量在田間定植期有顯著差異，但花球採收及整地後，各品種(系)間已無差異且整體變動趨勢相似。在 2010 年定植後第 105 d 仍有顯著差異的微生物族群為格蘭氏陰性菌、尿素氧化菌與纖維分解菌。利用變性膠體梯度電泳法分析基改 *ipt* 與非基改青花菜至種植 60 d，土壤微生物 rDNA 的相似性以 103 轉殖系與 104 自交系(CK)相似性係數較相近，且高於商用品種「綠王」，此結果與根圈真菌群落分布一致；2009 與 2010 兩個年度之相似度分析試驗結果亦相一致。

關鍵詞： 基因改造作物、根圈、微生物、安全評估、相似性係數。

* 通信作者, yktu@tari.gov.tw
投稿日期：2012 年 11 月 28 日
接受日期：2013 年 1 月 3 日
作物、環境與生物資訊 10:1-15 (2013)
Crop, Environment & Bioinformatics 10:1-15 (2013)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung 41362, Taiwan ROC

Assessment of Leaf Microflora and Soil Microorganisms Associated with *ipt* Transgenic Broccoli

Po-Yu Ting[1], Hang-Wei Chen[2], Lit-Fu Chan[3] and Yuan-Kai Tu[2]*

[1] Graduate Institute of Biochemical Sciences and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung 41349, Taiwan ROC
[2] Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung 41362, Taiwan ROC
[3] Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung 41362, Taiwan ROC

ABSTRACT

The rapid development of transgenic technology has raised the concern of potential impact for genetically modified plant to the environment. In this study, *isopentenyl transferase* (*ipt*) transgenic broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) inbred line 103, non-transgenic inbred line 104, and the commercial F_1 hybrid variety ‘Green

King' were used for investigation on the influence of transgenic broccoli to environmental microbial communities. As results indicated, *ipt* transgenic broccoli showed no effect on soil pH, while higher content of rhizosphere organic matter examined in 103 transgenic line at the transplantation day. However, soil organic matter data showed no significant difference in all lines after ninety days. In 2010, total number of fungi and bacteria were estimated, and inbred line 104 displayed significantly higher counts than other lines. Besides, almost all kinds of microbial population showed significant difference between transgenic and non-transgenic lines during the planting season. There is no significant difference after harvest and tillage. Nevertheless, population differences in gram-negative bacteria, urea-oxidizing bacteria and cellulolytic bacteria existed in 105th day after transplantation in 2010. From examination of the similarity coefficient of soil microorganisms between transgenic and non-transgenic broccoli lines, it showed that commercial F_1 hybrid variety 'Green King' displayed lower similarity coefficient score than the other two lines.

Key words: GMOs, Rhizosphere, Microorganisms, Safety assessment, Similarity coefficients.

前言

根據國際農業生物技術應用推廣協會(International Service for the Acquisition of Agribio-tech Applications; ISAAA)2010 年統計年報顯示，基因改造(以下稱基改)作物上市 10 年後，全球栽培面積達 8 千萬公頃，已經成長至 1 億 6 千萬公頃，約佔全球作物種植總面積十分之一，主要作物如玉米、黃豆、棉花、油菜之基改種子平均總採用率也超過一半。隨著基改作物栽培面積增加，大眾對於基改作物是否造成環境與生態衝擊的疑慮也隨之提高(James 2011)。土壤微生物是土壤重要組成分之一，參與有機質分解、固氮、硝化等作用，在養分循環中扮演極重要的角色。因此，維持土壤微生物群落組成的多樣性，有助於土壤團粒結構之維持，並對環境生態系統有正面影響。但土壤微生物群落易受到氣候、環境、耕作模式、農業化學藥品使用的影響，甚至栽培作物之種類都可能造成土壤微生物相結構的改變(Dunfield and Germida 2001, 2003, 2004, Castaldini *et al*. 2005, Liu *et al*. 2006, Rona *et al*. 2010)。

基改作物於田間種植後，其外源基因、基因表現產物或植物殘體可被土壤中的昆蟲和微生物分解與攝入，而發生基因水平轉移現象(horizontal gene transfer; HGT)，此現象常見於自然界，也是真菌與原核生物演化的重要機制。學界對於栽培基改作物造成的基因水平轉移，是否影響土壤微生物群落分布持兩派意見。Castaldini *et al.* (2005)證實轉殖蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*) *cry* 基因的抗蟲基改作物對其根圈(rhizosphere)附近菌根菌有明顯影響；基改 *Bt* 基因的玉米對田間生態系統之根圈土壤微生物群落亦有顯著影響(Rona *et al*. 2010)。但 Dunfield and Germida (2003)指出，基改油菜對土壤微生物群落的影響不具持久性，因為越冬後基改和非基改油菜的土壤微生物群落之間差異並不顯著。而表現 *Bt* 的棉花或馬鈴薯其根系分泌物與對照組相比，對根圈土壤微生物群落影響不顯著(Shen *et al*. 2006)。

目前關於基改作物對植物和動物的影響有許多研究，但對土壤微生物群體的影響卻研究較少，對土壤生態系統最令人擔憂的後果是基改作物可能激發或抑制非目標微生物種類，使土壤微生物群體結構發生變化。隨時間累積及生物聚集作用之擴大，其危害風險具高度的不可預期性，可能最終導致生態系統功能改變的風險。Milling *et al.* (2005)的研究指出，基改馬鈴薯 SIBU SI 與非基改親本品種 SIBU 相比，兩者根圈微生物群落差異不大，而非基改親本品種 SIBU 和常用栽培品種 Solana 間的差異較顯著，顯示基改馬鈴薯對根圈土壤微生物群落沒有影響或影響甚微。因此，將基改作物受體親本品種與常用栽培品種對土壤微生物的差異性列入考量，

更能客觀地評估基改作物對土壤微生物之安全(O'Callaghan *et al*. 2004)。

在基改作物對環境影響的研究中，常選擇測定微生物群落的變動，包括土壤微生物之群落組成、數量、及多樣性，作為基改植物環境風險評估的重要指標(Kirk *et al*. 2004, Lynch *et al*. 2004)。土壤微生物相之研究方法眾多，例如平盤塗佈法、土壤酵素活性分析、微生物代謝分析法、微生物脂質分析、微生物 DNA 分析等，但常遭遇鑑別力不足，或菌種間交互作用無法偵測的缺點(Liu *et al*. 2006)。因此，利用分子生物技術建立 DNA 層次的研究，調查土壤微生物族群間結構與環境的關係，現已成為土壤微生物生態學之趨勢(Ma 2004)。本研究主要測量基改異戊烯轉移酶(isopentenyl transferase; *ipt*)青花菜於田間試驗栽培期間，葉表面與根圈土壤樣品中總細菌數與總真菌數的消長，並利用選擇性培養基針對尿素氧化菌(urea-oxidizing bacteria)、溶磷菌(phosphate-solubilizing bacteria)、蛋白分解菌(protease bacteria)、纖維分解菌(cellulose-decomposing fungi)、格蘭氏陰性菌(gram-negative bacteria)及放線菌(actinomycetes)等指標性微生物族群數目進行調查。本研究亦利用變性梯度膠體電泳(denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE)技術，分析基改 *ipt* 青花菜植株根圈土壤微生物相似性，以探討基改青花菜對於根圈土壤生態系中微生物多樣性的影響，並以此作為基改 *ipt* 青花菜對非目標微生物影響之安全性評估判斷依據。

材料與方法

參試材料與採樣方法

本試驗所採用之基改 *ipt* 青花菜材料，由中央研究院植物暨微生物學研究所陳榮芳教授所提供，並經田間選拔植株較優良且具延遲花球老化之 103 轉殖系自交 T_5 代，與未轉殖「綠王」104 自交系(自交 T_5)，以及商用一代雜交「綠王」(Green King; GK)品種(Chen *et al*. 2001, Chan *et al*. 2009)。本試驗於 2009 及 2010 年在行政院農業委員會農業試驗所隔離設施內進行，參試青花菜品種(系)依一般傳統秋作栽培模式，幼苗達 4 片本葉時定植於隔離試驗田。田間配置採逢機完全區集設計(randomized complete block design; RCBD)，共 4 區集。每一品系之小區畦長 10 m，寬 1.5 m (含畦溝寬度)，株距 0.45 m、行距 0.60 m，種植 15 株。

葉片採樣係以隨機採樣方式，每一區集選定 3–5 株，取其健康葉片合計 0.2 g，進行葉表真菌與細菌總量估算。土壤試樣之採集同上述隨機採樣方式，分別對表土與深度 15 cm 之土壤層進行採樣，每區集選定三處植株栽培位置為採土點，各採集 100 g 土壤後混合。田間定植後每隔 15 d 採集葉表與土壤樣品一次，以進行微生物相之檢測調查。

土壤質地分析

土壤樣品參照上述土壤採樣方式，採集 2009 年田間栽培試驗期間之土壤。土壤 pH 值測定係參考 Mclean (1982)之方法，取 20 g 土壤樣品加 20 mL 蒸餾水，攪拌混均勻 30 分鐘，靜置懸浮液 1 h，以酸鹼檢測儀測量土壤溶液 pH 值，試驗取樣 4 重複。土壤有機質含量係參照 Walkey-Black 法，自上述 100 g 土壤中取 0.5 g，測定土壤總有機質含量(Soon and Abboud 1991)。

葉表面與土壤微生物之估算

1. 此試驗利用稀釋塗抹法，將採集之葉片樣品以無菌水進行系列稀釋，取 100 μL 之 100 倍稀釋液分別塗抹於真菌生長的 PDRA (peptone dextrose rose bengal agar)，培養基配方為 peptone: 5 g, dextrose: 10 g, K_2HPO_4: 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.5 g, agar: 15 g, 121℃、1.2 kg cm^{-2}，滅菌 15 min，待冷卻加入 300 ppm 的 Streptomycin 1 mL 及 1%的 Rose Bengal 250 μL，最終定量至 1 L (Mislivec *et al*. 1992)；與細菌生長的 PCA (plate count agar)，培養基配方每 1 L

為 tryptone: 5.0 g, yeast extract: 2.5 g, glucose: 1.0g, bacteriological agar: 12.0 g。將塗抹完畢之真菌與細菌培養基置於 25℃培養 5 d，總真菌數及總細菌數依照稀釋倍數推算出原菌液濃度(公式如下)，試驗重複 4 次。

colony-forming unit per mL =
number of colonies × dilution factor

2. 將 1 g 土壤樣品加入試管，取無菌水加入試管將總體積定量至 10 mL，此時試管為 10 倍稀釋，即 10^{-1} 倍稀釋液，以試管振盪器混和均勻，進行系列稀釋後，將 100 µL 的土壤樣品稀釋液分別塗抹於不同的選擇性培養基，除了偵測總真菌數及總細菌數，包含下列指標性微生物族群數:

(1) 尿素氧化菌：培養基配方為 peptone: 5 g, K_2HPO_4: 0.5 g, NaCl: 0.25 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.5 g, $FeSO_4$: 0.01 g, agar: 20 g，最終體積定量至 1 L，將 pH 調至 7.2。

(2) 溶磷菌: 原液配方分別為 NH_4NO_3: 27 g 100 mL^{-1}, KCl: 20 g 100 mL^{-1}, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 10 g 100 mL^{-1}, 微量元素以 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.1 g 及 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.1 g 配置成 100 mL, yeast extract: 10 g 100 mL^{-1}, 培養基配方 sucrose: 39 g, $Ca_3(PO_4)_2$: 3 g, agar: 20 g, 上述各 5 種原液配方取 1 mL, 將 pH 調至 6.8，最終體積定量至 1 L (Nautiyal 1999)。

(3) 蛋白分解菌：培養基配方為 trytone: 5 g, yeast extract: 3 g, skimmed milk: 25 g, bacteriological agar: 12 g，最終體積定量至 1 L (Tang *et al.* 2008)。

(4) 纖維分解菌: 培養基配方為 cellulose powder: 10 g, K_2HPO_4: 2 g, $(NH_4)_2SO_4$: 2.4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.3 g, agar: 8 g，最終體積定量至 1 L (Teather and Wood 1982)。

(5) 格蘭氏陰性菌: 培養基配方為 enzymatic digest of gelatin: 10g, lactose: 5 g, sucrose: 5 g, dipotussium phosphate: 2 g, eosin Y: 0.4 g, methylene blue: 0.065 g, agar: 13.5 g，最終體積定量至 1 L。

(6) 放線菌：培養基配方為 PDA:6 g, agar: 10 g, potassium sorbate (1,000 ppm): 10 mL, rose Bengal (150 ppm): 10 mL, streptomycin (250 ppm): 10 mL, allyl alcohol (500 ppm): 5 mL，最終體積定量至 1 L。

稀釋後菌液塗抹於不同選擇性培養基(121℃、1.2 kg cm^{-2}，滅菌 15 min)，於 25℃培養 5 d，每一微生物之測定皆進行 4 重複，其總生菌數依照稀釋倍數推算出原菌液濃度(公式如葉表面之估算)。

變性膠體梯度電泳法分析土壤微生物相似度

使用 UltraClean Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories)抽取土壤微生物 DNA。PCR 設備為 C1000 Thermal Cycler；PCR 試劑採用 PCR Master Mix Kit (GeneMark)。針對細菌之 16S rDNA 基因與真菌之 18S rDNA 基因，使用引子對 NS1: 5′-gtagtcatatgcttgtctc-3′、FUNG: 5′-attccccgttacccgttg-3′、FR1: 5′-aiccattcaatcggtant-3′(n = a, t, c, g)與 FF390: 5′-cgataacgaacgagacct-3′，PCR 反應條件係參照 Lin *et al.* (2010) 之方法。DGGE 採用 Bio-Rad 公司「The Dcode™ Universal Mutation Detection System」系統，製備膠片的設備為「Model 475 Gradient Delivery System」。變性梯度的條件為 40–80% 與 20–40% (urea/formamide)，各為 25 mL。電泳條件為電壓 250 V，溫度 56℃，進行電泳時間為 2 h。

統計分析

基改 *ipt* 與非基改青花菜之土壤酸鹼值、有機質與微生物量差異性比較，係利用 SAS EG 統計分析軟體(SAS Institute, Inc. 2006)，進行變方分析與最小顯著差異性測驗。基改 *ipt* 及非基改青花菜之土壤微生物相似性係數利用 PAST (PAleontological STatistics Version 2.14)軟體，計算 Jaccard's 相似性係數(similarity coefficients)，並以未加權算術平均法(unweight pair group method

using arithmetic averages; UPGMA)進行歸群分析，估算基改 *ipt* 與非基改青花菜對照組間土壤微生物族群間的相似性係數的差異。

結果

基改 *ipt* 青花菜對土壤質地的影響

為了解基改 *ipt* 青花菜之栽培對根圈土壤質地造成的影響，試驗期間，定期取表土與深度 15 cm 之土壤進行土壤 pH 值分析，基改 *ipt* 與非基改青花菜之表土及深度 15 cm 之 pH 值在定植期間介於 6.7–7.9，無顯著差異(變動範圍 $p < 0.05$) (Table 1)。土壤有機質可安定土壤團粒，並作為土壤微生物碳源與養份的主要來源，定植當天表土與深度 15 cm 土壤有機質含量均以 103 轉殖系顯著較高；定植後第 30 d 基改 *ipt* 青花菜及 104 自交系表土有機質含量顯著高於 GK 品種，然而第 60 d 係以 103 轉殖系之含量為最高，第 90 d (花球採收後)，基改 *ipt* 與非基改青花菜品系間有機質含量無顯著差異(Table 2)。

基改 *ipt* 青花菜對葉表微生物數量消長之影響

葉片為微生物養份供應來源之一，調查葉表面之總真菌數與總細菌數消長，可提供基改 *ipt* 青花菜是否對非目標微生物影響依據之一。葉表微生物之總真菌數與總細菌均以 2009 年較 2010 年多，然而基改 *ipt* 與非基改青花菜之葉表面微生物總量變化在兩年間的趨勢一致[Fig. 1(A)]。2010 年真菌與細菌微生物量分別在植株生長第 90 d (採收期)及苗期(第 15 d)，以 104 自交系顯著高於 103 轉殖系與 GK 品種，但至第 90 d (採收期)細菌數則無顯著差異[Fig. 1(B)]。

Table 1. pH value of soils planted with transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety ‘Green King (GK)’.

Treatment	Variety /line	Days after transplanting		
		30	60	90
0 cm	103	7.5±0.1 a[z]	7.2±0.2 a	7.7±0.2 a
	104 (CK)	7.7±0.1 a	7.1±0.2 a	7.0±0.3 a
	GK	7.5±0.2 a	7.3±0.1 a	7.2±0.2 a
15 cm	103	7.6±0.1 a	7.4±0.1 a	7.6±0.2 a
	104 (CK)	7.7±0.2 a	7.3±0.1 a	7.2±0.3 a
	GK	7.5±0.2 a	7.4±0.1 a	7.4±0.2 a

[z] Mean ± standard error (n = 4). Within treatment for each sampling time, each value in the same column followed by the same letter is not significantly different at 5% level by LSD test.

Table 2. Organic matter content of soils planted with transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety ‘Green King (GK)’.

Treatment	Variety /line	Organic matter content (%)			
		0	30	60	90
0 cm	103	2.0±0.04 a	2.0±0.04 a[z]	1.9±0.04 a	1.8±0.12 a
	104 (CK)	1.7±0.08 b	1.8±0.08 a	1.6±0.06 b	1.7±0.08 a
	GK	1.7±0.06 b	1.7±0.05 b	1.6±0.10 b	1.6±0.08 a
15 cm	103	1.9±0.03 a	1.9±0.05 a	1.9±0.10 a	1.9±0.06 a
	104(CK)	1.6±0.08 b	1.7±0.06 a	1.7±0.08 a	1.7±0.06 a
	GK	1.7±0.06 b	1.8±0.07 a	1.7±0.08 a	1.7±0.08 a

[z] Mean ± standard error (n=4). Within treatment for each sampling time, each value in the same column followed by the same letter is not significantly different at 5% level by LSD test.

基改 *ipt* 青花菜對土壤微生物數量消長之影響

調查土壤有益菌的項目中，種植基改與非基改青花菜過程中真菌、細菌、溶磷菌、蛋白分解菌及放線菌族群含量具有差異，在第 105 d 為花球採收後已整地時期，其轉殖系與兩個非轉殖系之間含量無顯著差異，且種植過程微生物趨勢變動大致相似(Fig. 2 及 Fig. 3)。除了革蘭氏陰性菌及尿素胺氧化菌和在 2010 年表土與深度 15 cm 土壤變動較大，且在第 105 d 基改與非基改青花菜間具顯著性差異，其中尿素胺氧化菌以 103 轉殖系與 GK 顯著高於 104 (CK) [Fig. 3(A)]；格蘭氏陰性菌以 103 轉殖系較兩個非轉殖品系低[Fig. 3(E)]；而纖維分解菌只在 2010 之 15 cm 土壤以 103 轉殖系與 104 (CK)之間沒有顯著差異，又以 GK 含量最少[Fig. 3(F)]。

DGGE 方法進行土壤微生物相似度分析

利用 DGGE 探討基改 *ipt* 與非基改青花菜之土壤真菌 18S DNA 及細菌 16S DNA 電泳圖譜如 Fig. 4 及 Fig. 5。第 15 d 調查相比較，經過一段時間於第 60 d 調查時，GK 品種之土壤細菌相與 103 轉殖系及 104 自交系之土壤細菌相的相似性係數降低至僅約 0.40–0.57，而 103 轉殖系及 104 自交系之間仍維持著第 15 d 調查時的高相似性係數值 0.83–1.00。真菌微生物族群相似度與細菌微生物族群變化極為相同，也在第 60 d 調查時 GK 品種土壤真菌相與 103 轉殖系及 104 自交系之相似度降低至 0.50–0.63 (Table 3)。2009、2010 年相似度分析試驗結果趨勢一致。

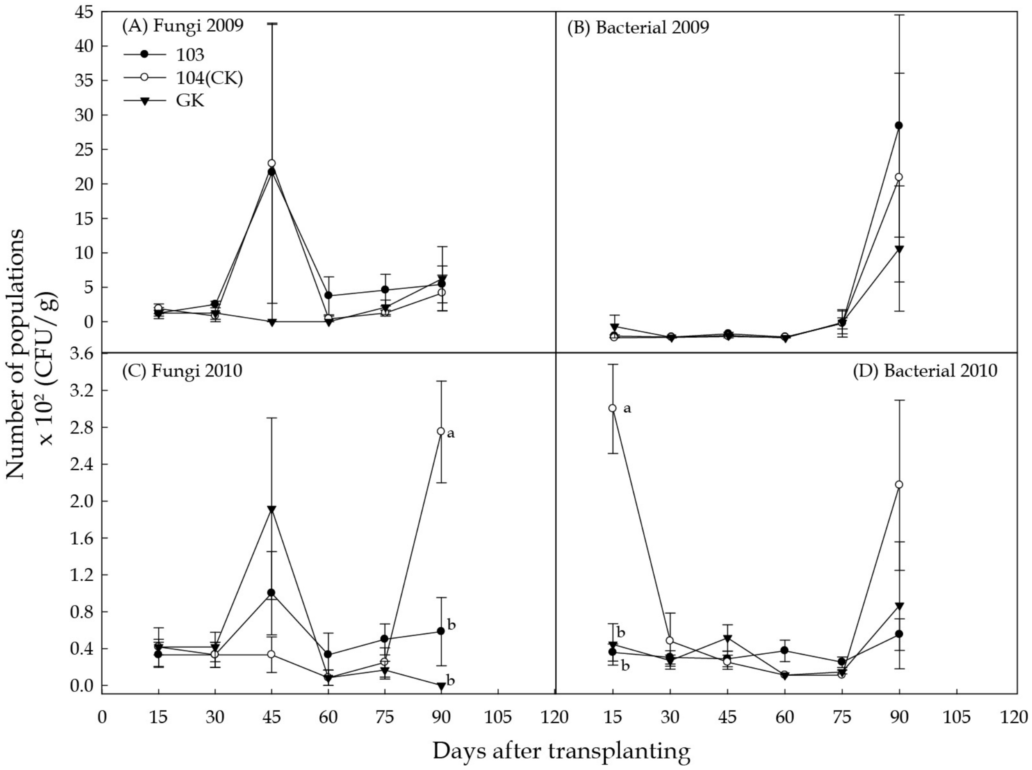

Fig. 1. Numbers of total leaf microorganisms of transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety 'Green King (GK)' in 2009 and 2010, respectively. Error bars represent standard error. Values with a different letter are significantly different from each other (p < 0.05).

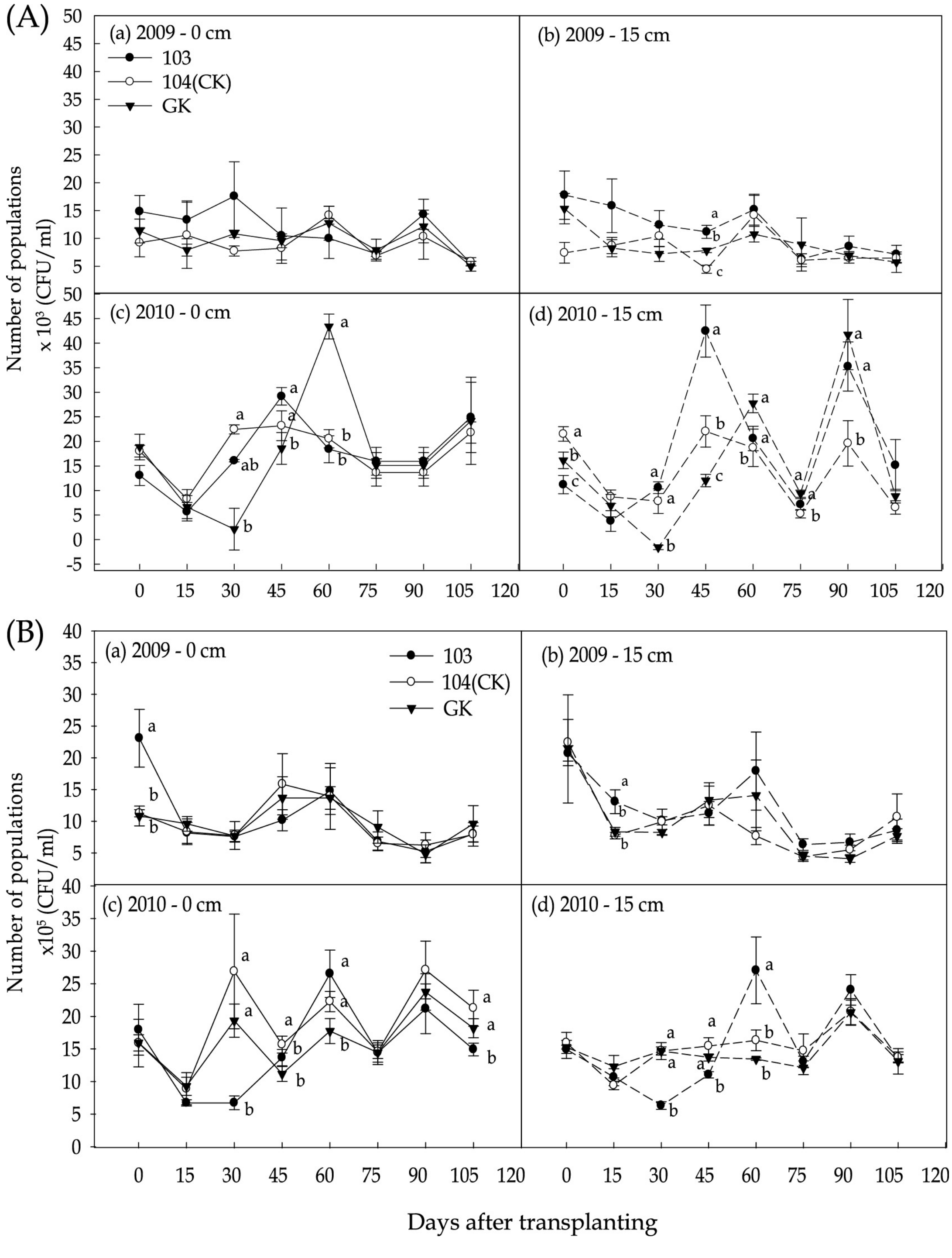

Fig. 2. Numbers of total soil microorganisms of transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety 'Green King (GK)' in 2009 and 2010, respectively. (A) fungi and (B) bacterial. Error bars represent standard error. Values with a different letter are significantly different from each other ($p < 0.05$).

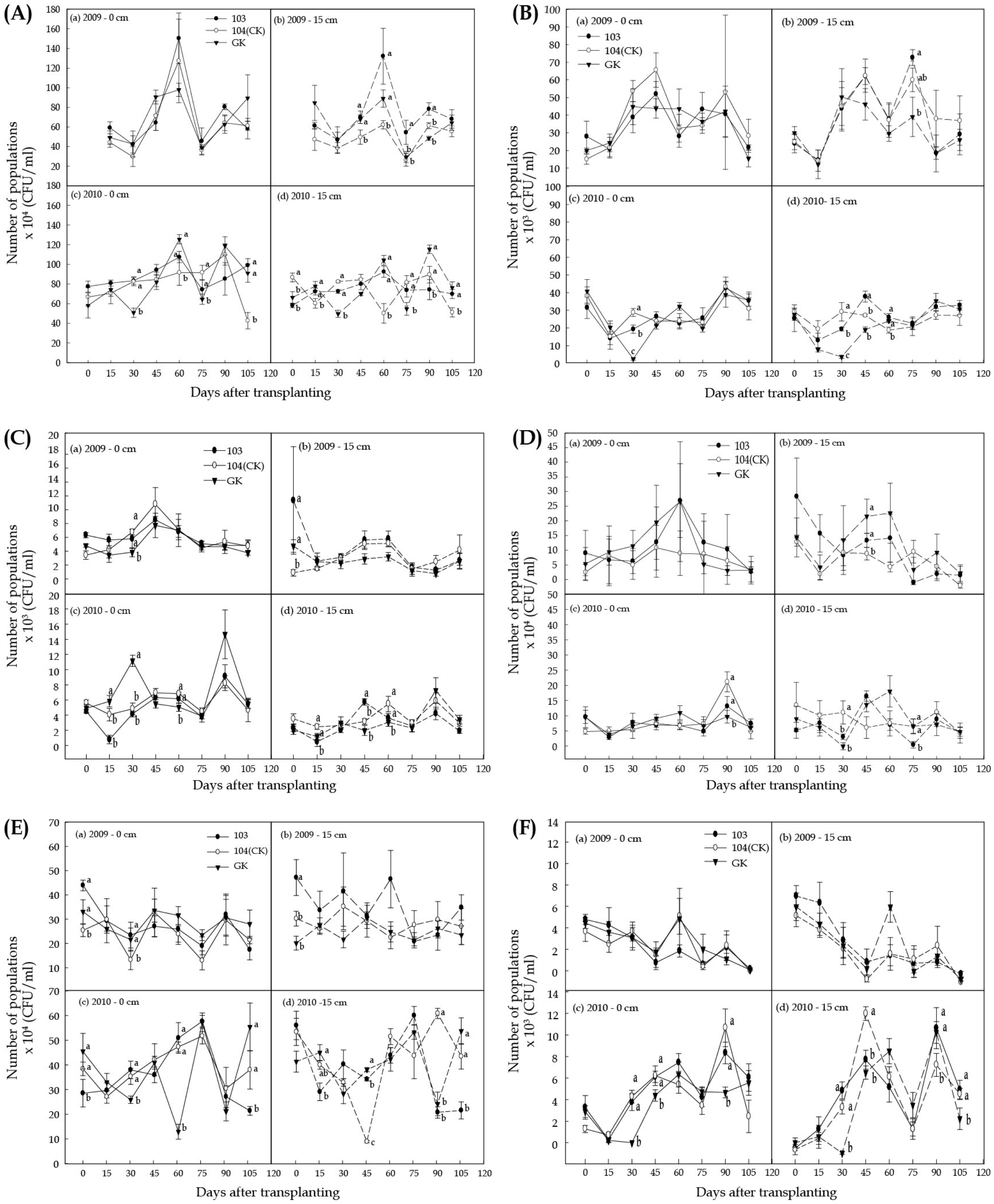

Fig. 3. Numbers of total soil microorganisms of transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety 'Green King (GK)' in 2009 and 2010, respectively. (A) urea-oxidizing bacteria numbers; (B) actinomycetes; (C) phosphate-solubilizing bacteria; (D) protease bacteria; (E) gram-negative bacteria; and (F) cellulose-decomposing bacteria. Error bars represent standard error. Values with a different letter are significantly different from each other (p < 0.05).

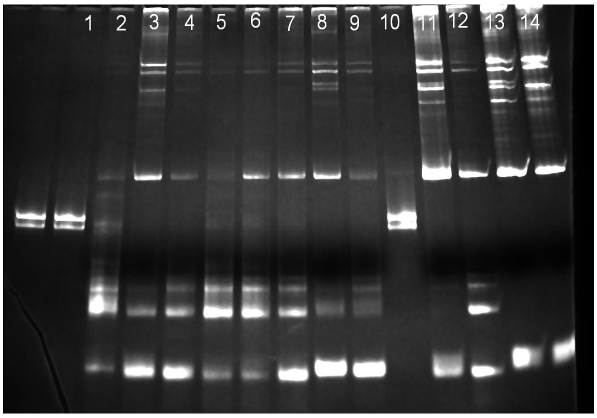

Fig. 4. DGGE pattern produced from 16S rDNA fragments amplified with DNA from transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety 'Green King (GK)' in 2009 and 2010, respectively. Lines 1 and 10: Marker. Lines 2 to 4: 103, 104 (CK) and GK at the 15th day in 2009. Lines 5 to 7: 103, 104 (CK) and GK at the 60th day in 2009. Lines 8, 9 and 11: 103, 104 (CK) and GK at the 15th day in 2010. Lines 12 to 14: 103, 104 (CK) and GK at the 60th day in 2010.

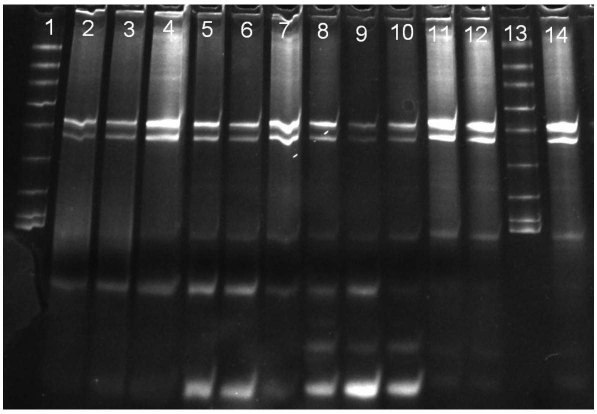

Fig. 5. DGGE pattern produced from 18S rDNA fragments amplified with DNA from transgenic *ipt* line (103), non-transgenic line (104-CK) and the parental variety 'Green King (GK)' in 2009 and 2010, respectively. Lines 1 and 13: Marker. Lines 2 to 4: 103, 104 (CK) and GK at the 15th day in 2009. Lines 5 to 7: 103, 104 (CK) and GK at the 60th day in 2009. Lines 8 to 10: 103, 104 (CK) and GK at the 15th day in 2010. Lines 11, 12 and 13: 103, 104 (CK) and GK at the 60th day in 2010.

討論

隨著農業生物技術之發展，基改作物種植面積增加，基改作物對環境生態影響亦受到正視。基改植株之殘體可透過土壤昆蟲和微生物的作用而分解，成為土壤生物的棲境和養分來源，可能對土壤中微生物的種類、數量以及活動情形產生影響。植物根部分泌多種化學物質，包括多種胺基酸、醣類及有機酸，具有改變緊鄰的土壤微生物群落分布、促進有利的微生物共生、改變根圈土壤的理化特性、或是抑制其他競爭生物生長之功能(Nardi *et al.* 2000)。土壤微生物具有趨化性(chemotaxis)反應，即微生物可感應植物根部分泌物質或養份，而朝根圈移動的現象，如番茄根尖所分泌的蘋果酸與檸檬酸，

可促進 *Pseudomomas fluorescens* 族群於番茄根圈之分布(Weert *et al*. 2002)。植物根部與土壤微生物間關係，還受到株齡、根部幾何結構，及根部外層多醣類組成的影響(Nannipieri *et al*. 2007)。本試驗以基改 *ipt* 青花菜 103 轉殖系、非基改的青花菜 104 自交系及一代雜交 GK 品種，分析微生物相群落之消長，作為基改 *ipt* 青花菜對非目標微生物族群結構影響的指標之一。在植物中表現 *ipt* 基因可提高內生細胞分裂素(cytokinin)的表現，轉殖株過量表現 *ipt* 時，則有節間短縮、失去頂芽優勢、葉片縮小、主根短縮及次生根減少的性狀(Smigocki and Owens 1988, Smigocki *et al*. 1993)，另外還有延遲老化(Chen *et al*. 2001)，改變次級代謝物含量(Sa *et al*. 2001)，增加抗蟲(Smigocki *et al*. 1993)抗病(Memelink *et al*. 1987)能力的表現。

本試驗分析栽種期間的土壤樣品，其 pH 值並未因栽培基改青花菜而改變，栽培期間基改 *ipt* 與非基改青花菜之土壤有機質含量雖有差異。作物營養要素的有效性會受到土壤 pH 值的影響，例如磷的有效性在 pH 6.5–7.5 最佳，鈣、鎂、鉬的有效性在 pH 6.5–8.0 最佳，鐵、錳、硼、鋅、銅的有效性在 pH 5.0–6.5 最佳。土壤微生物在 pH 5.0–8.0 活性最佳，平均表現以 pH 6.0–7.0 的環境下最適，pH 6.0–7.0 是適合大多數作物生長的土壤酸鹼度。本試驗研究之土壤 pH 值在 7.0–7.7 之間，種植基改青花菜之土壤 pH 值在 7.2–7.7 之間，並無超過其範圍且無顯著差異。一般耕作土壤有機質含量應該適度維持在 2–3%，而土壤有機質對促進土壤形成團粒構造、降低土壤對磷肥的固定作用、增加土壤陽離子交換能量和鹽基飽和度、提升土壤中微量要素的有效性、提供作物生育促進物質等的貢獻度非常重大。透過微生物的活動，分解土壤中粗大的動植物有機質殘骸，一方面釋放出作物可吸收的氮、磷、鉀等營養元素，一方面形成腐植質，改善土壤性質及對土壤肥力提升的貢獻很大。檢測基改 *ipt* 非基改青花菜土壤有機質含量，種植過程以基改 *ipt* 青花菜有機質含量較非基改青花菜高，然而第 90 d 花球採收後含量已無差異，臨界於 2%(如 Table 2)，可推論基改 *ipt* 青花菜之栽培不會改變土壤 pH 值與有機質含量。

葉表微生物量分析結果顯示，植株定植當天至第 45 d 結球前期，葉表總真菌量增加，在 60–75 d 葉表微生物量甚低，至第 90 d 稍微升高。葉表微生物量消長的原因，可能是因為葉片為植物主要的養分供應源，異營性真菌分布多，然而定植後第 90 d 花球採收後，田間植物殘株好發十字花科細菌性黑腐病 (*Xanthomonans campestris* pv. *campestris*)，同時易造成 *Erwinia* spp. 及 *Pseudomonas* spp. 的共同感染(Williams 1980)，可能是造成總細菌量增加的原因。*ipt* 基因具延遲老化功能，103 轉殖系生長勢較佳(Chan *et al*. 2009)，*ipt* 轉殖菸草之 cytokinin 含量提高 25 倍，改變轉殖菸草次級代謝物路徑，提高酚類化合物的含量，可降低天蛾(*Manduca sexta*)及蚜蟲(*Myzus persicae*)對轉殖株葉片的攝食量(Smigocki *et al*. 1993)，基改 *ipt* 青花菜的次級代謝物對葉表微生物含量亦可能造成影響，但仍需進一步試驗才能證實。而在 2010 年的試驗中，定植後第 15 d 與第 90 d，葉表面細菌與真菌含量以非基改的 104 自交系顯著高於 103 轉殖系及 GK 品種，可能是植株本身營養成分含量的差異所造成。利用大規模平行定序 (massively parallel signature sequencing)的策略分析 *ipt* 轉殖阿拉伯芥之基因表現變化，顯示 *ipt* 基因誘導表現後 24 h，阿拉伯芥基因組中有 823 個基因的表現量隨 cytokinin 含量提高而增加，另有 917 個基因的表現量則隨之降低，顯示 *ipt* 基因表現後提高 WRKY 轉錄因子的生成量，進而活化或抑制下游基因的表現(Hoth *et al*. 2003)，Ting *et al*. (2008)曾分析基改 *APU*(amylopullulanase)水稻之葉片、稻

桿及稻穀等不同部位的成分，雖與受體親本品種 TNG67 波峰相似，但其成分含量上的差異，亦可能直接或間接影響葉表微生物之總量。

依據 2007 年行政院農業委員會所制定「基因轉殖植物遺傳特性調查及生物安全評估原則」，進行基改 *ipt* 青花菜之土壤有益微生物族群調查。本試驗分析結果如 Fig. 2 及 Fig. 3，在多種微生物調查項目中，基改青花菜可能影響種植期間土壤之總真菌、總細菌數量、放線菌、溶磷菌與蛋白分解菌族群數量之變化有影響，但基改與非基改青花菜對照品系間微生物群落消長變化趨勢相似。Donegan *et al.* (1997)指出落葉會影響土壤微生物族群的變化，因為土壤微生物可根據葉片組成分的不同，而發展相對應的微生物群落。第 105 d 花球採收後之土壤樣本顯示，基改與非基改青花菜微生物族群數量已無顯著差異。在 Griffiths *et al.* (2000)研究中也發現類似情形，調查可生產凝集素 *Lectins* (Con A)及 *Agglutinia* (GNA)的基改馬鈴薯對土壤群落之影響，結果顯示基改馬鈴薯可改變根圈微生物群落的生理特性，但當基改馬鈴薯收穫後，該影響便消失。基改植物造成土壤微生物群落差異，通常只是暫時性的出現於基改植物栽培的某個週期(Oger *et al.* 1997, 2000)。然而在 2011 年第 105 d 仍有差異的微生物族群為格蘭氏陰性菌、尿素氧化菌與纖維分解菌。尿素氧化菌與纖維分解菌以 GK 品種含量最少[Figs. 3(A)、3(F)]。革蘭氏陰性菌在表土及 15 cm 土壤層以 103 轉殖系含量顯著較未轉殖對照品系為少 [Fig. 3 (E)]。植物根圈土壤結構複雜組成，基改植物對土壤特定微生物產生的顯著影響可能是由於轉殖植株生理特性的改變，或外源基因產物之化學和生物學特性所引起(Melnitchou *et al.* 2006）。Cytokinin 可抑制主根伸長(Medford *et al.* 1989)及次生根的發生(Werner *et al.* 2003)，基改 *ipt* 與非基改阿拉伯芥對照株根系幾何結構不相同，因為過量的 cytokinin 隨微管束運輸後會累積在根部伸長區及細胞分裂區間，造成該部位乙烯表現量增加，造成主根短縮的現象，而 cytokinin 在根尖分生組織的表現量超過門檻濃度時，會使根尖細胞分裂區的新生細胞數目減少，提高內生 cytokinin 含量亦影響次生根原體 (lateral root primordia)早期分化，抑制次生根的形成(Kuderova *et al.* 2008)。白花羽扇豆根圈微生物群落分析顯示，根圈微生物群落分布與株齡相關，但因為植物的年齡決定全株碳水化合物之分配 (Warembourg and Paul 1973)，且株齡與根部分泌物種類組成極為相關(Rovira 1959)，最終可歸因於不同株齡之根部分泌物種類不同所致(Marschner *et al.* 2002)。植物根部分泌的低分子量次級代謝物種類超過 100,000 種，可拮抗環境中不利的微生物、低等植物或昆蟲(Dixon 2001)。基改 *ipt* 黃花蒿(*Artemisia annua*)之葉綠素含量提高 20-60%，旺盛的細胞代謝可提高轉殖株次級代謝物之表現量，使轉殖株的黃蒿素(artemisinin)較未轉殖的對照株提升 30-70% (Sa *et al.* 2001）。此外，大部分的細菌都具有群數感應(quorum sensing)現象，是細菌能偵測本身族群密度而同時改變群體性狀表現的一種特性，外加 IAA(indole-3-acetic acid)與 cytokinin 能調控 *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* 的群數感應訊號分子之表現(Chalupowicz *et al.* 2009)，野生燕麥 (*Avena fatua*)細胞活力較旺盛的根尖與根毛區域可偵測到較高活性的微生物礦化作用酵素幾丁質分解酶 (chitinase) 與蛋白質水解酶(protease)，該區也偵測到較高的群數感應信號分子及土壤微生物族群數量，顯示年輕及活力旺盛的野生燕麥根系細胞，可藉根尖分泌物質調控根圈附近微生物群數感應訊號分子的表現，進而影響根圈附近微生物群落消長(DeAngelis *et al.* 2008)。種植基改 *ipt* 青花菜使土壤中格蘭氏陰性菌減少之原因，是土壤微生物對轉殖株根部所分泌次級代謝物的趨化性反應，或是轉殖株根部幾何結構改變

微生物棲境所致，仍待進一步探討。

田間自然環境下的土壤微生物組成極為複雜，許多重要微生物的分類方法學已被建立，但受限於培養基和培養條件，以人工培養分離所得的微生物種類和數量僅占估計量的 1–5% (Amann and Ludwig 2000, Shakira *et al*. 2010)。因此開發多種技術克服傳統培養方式的限制，如利用 16S rDNA 及 18S rDNA 片段多型性的檢測，分析方式包括變性梯度凝膠電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE)、溫度梯度凝膠電泳 (temperature gradient gel electrophoresis; TGGE)、末端螢光標定限制片段多型性分析 (terminal-restriction fragment length polymorphism; T-RFLP)、rDNA 片段放大限制分析 (amplified ribosomal DNA restriction analysis; ARDRA) 與核糖體基因間格區分析(ribosomal intergenic spacer analysis; RISA) (Johnson *et al*. 2003)。其中 DGGE 已廣泛的被利用在土壤微生物之監測上(Bloem and Breure 2003)，且已為經濟合作發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD)認可(OECD 2003)。本試驗利用 DGGE 技術分析基改 *ipt* 青花菜土壤中真菌 18S rDNA 及細菌 16S rDNA 族群相似性係數。結果顯示，定植第 15 d 各品系間仍維持高相似性係數，至第 60 dGK 品種的相似性係數卻降低。由於 103 轉殖系與 104 自交系皆經過組織培養與再生的過程，據研究指出這些過程可能對植株生理產生影響(Zhang *et al*. 2001)，由此可解釋土壤微生物族群相似性係數以 103 轉殖系與 104 自交系較接近，而 GK 品種則相似性較低。不同基因型的植物其根圈土壤微生物群落結構存在一定的差異，即使相同基因型的植物，在不同的生長發育階段根圈微生物的群落結構亦不同。到目前為止，未有文獻證實土壤中少量外源基因產物對土壤微生物活性的影響，或土壤中的累積外源基因產物而造成微生物群落結構的改變(Wei *et al*. 2006)。

目前對於植物、環境及微生物之間的脈絡了解有限，農業管理措施及乾旱、病害、氣候變化等環境影響因子，與土壤微生物群落分布關係密切，即便於相同一根圈內之不同部位的微生物群落組成也不盡相同 (Dunfield and Germida 2001, 2004)。以分子生物或生化代謝等替代策略，仍會遇到無法鑑別的難題(Gu *et al*. 2008)。此外，土壤性質與施肥的方式對土壤微生物群落分布影響很大，因為土壤中微植物相含量固定，主要微生物群落分布亦相當穩定，因外在環境因子與栽培作物根系之影響可能很微弱或是非常短暫(Nannipieri *et al*. 2003)，探討基改作物對土壤微生物群落之影響，仍需要長期追蹤與多次田間試驗重複。

引用文獻

Amann R, W Ludwig (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiol Rev.** 24: 555–565.

Bloem J, AM Breure (2003) Microbial indicators. p.259-282. *In*: Bioindicators/Biomonitors- Principles, Assessment, Concept. BA Markert, A M Breure, HG Zechmeister (eds.) Elsevier, Amsterdam.

Castaldini M, A Turrini, C Sbrana, A Benedetti, M Marchionni, S Mocali, A Fabiani, S Landi, F Santomassimo, B Pietrangeli, MP Nuti, N Miclaus, M Giovannetti (2005) Impact of *Bt* corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:6719–6729.

Chalupowicz L, I Barash, M Panijel, G Sessa, SM Sasson (2009) Regulatory interactions between quorum sensing, auxin, cytokinin, and the Hrp regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *hypsophilae*. **Mol. Plant-microb. Interact.** 22: 849–856.

Chan LF, LFO Chen, HY Lu, CH Lin, HC Huang, MY Ting, YM Chang, CY Lin, MT Wu (2009) Growth, yield and shelf-life of isopentenyl transferase (*ipt*)-genetransformed broccoli. **Can. J. Plant. Sci.** 89:701–711.

Chen LFO, JY Hwang, YY Charng, CW Sun, SF Yang (2001) Transformation of broccoli (*Brassica*

oleracea var. *italica*) with isopentenyl transferase gene *via Agrobacterium tumefaciens* for postharvest yellowing retardation. **Mol. Breed.** 7:243–257.

DeAngelis KM, SE Lindow, MK Firestone (2008) Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizosphere soil. **FEMS Microbiol Ecol.** 66:197–207.

Dixon RA (2001) Progress nature products and plant disease resistance. **Nature** 411:843–847.

Donegan KK, RJ Seidler, VJ Fieland, DL Schaller, CJ Palm, LM Ganio, DM Cardwell, Y Steinberger (1997) Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: Persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. **J. Appl. Ecol.** 34: 767–777.

Dunfield KE, JJ Germida (2001) Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiol. Ecol.** 38:1–9.

Dunfield KE, JJ Germida (2003) Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Appl. Environ. Microbiol.** 69:7310–7318.

Dunfield KE, JJ Germida (2004) Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **J. Environ. Qual.** 33:806–815.

Geng S, M Ma, HC Ye, BY Liu, GF Li, K Chong (2001) Effects of *ipt* gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. **Plant Sci.** 160:691–698.

Griffiths BS, IE Geoghegan, WM Robertson (2000) Testing genetically engineered potato, producing lectins GNA and Con A, on montage soil organisms and proses. **J. Appl. Ecol.** 37:159–170.

Gu YF, XP Zhang, SH Tu (2008) Application of denaturing gradient gel electrophoresis to the study of soil microbial diversity. **Soils** 40:344–350.

Hoth S, Y Ikeda, M Morgante, X Wang, J Zuo, MK Hanafey, T Gassterland, SV Tingey, NH Chua (2003) Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett.** 554:373–380.

James C (2011) Global Status of Commercialized Biotech /GM Crop: 2011. ISAAA Brief No. 43. Ithaca, NY.

Johnson MJ, KY Lee, KM Scow (2003) DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma** 114:279–303.

Kirk JL, LA Beaudette, M Hart, P Moutoglis, JN Klironomos, H Lee, JT Trevors (2004) Methods of studying soil microbial diversity. **J. Microbiol. Methods** 58:169–188.

Kuderova A, I Urbankova, M Valkova, J Malbeck, B Brzobhaty, D Nemethova, J Hejatko (2008) Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings. **Plant Cell Physiol.** 49: 570–582.

Lin CH, TM Pan (2010) PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to assess the effects of a genetically modified cucumber mosaic virus-resistant tomato plant on soil microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 76: 370–373.

Liu BR, GM Jia, J Chen, G Wang (2006) A review of methods for studying microbial diversity in soils. **Pedosphere** 16:18–24.

Lynch JM, A Benedetti, H Insam, MP Nuti, K Smalla, V Torsvik, P Nannipieri (2004) Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biol. Fertil. Soils** 40:363–385.

Ma WL, J Tibbits, M Adams (2004) A new method for research on soil microbial diversity. **Acta Pedologica Sinica** 41:103–107.

Marschner P, G Neumann, A Kania, L Weiskopf, R Lieberei (2002) Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). **Plant Soil** 246: 1671–174.

Mclean EO (1982) Soil pH and lime requirement. 9:199-223. In: Methods of Soil Analysis. Part 2-Chemical and Microbiological Properties. AL Page, RH Miller, DR Keeney (eds.) Amer. Soc. Agron./Soil Sci. Soc. Amer. Madison, WI.

Medford JI, RH Horgan, Z El-Sawi, HJ Klee (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **Plant Cell** 1:403–413.

Melnitchouck A, P Leinweber, I Broer, KU Eckhardt (2006) Pyrolysis-field ionization mass spectrometry of rhizodeposits a new approach to identify potential effects of genetically modified plants on soil organisms. **Environ. Biosafety Res.** 5:37–46.

Memelink J, JHC Hoge, RA Schilperoot (1987)

Cytokinin stress changes the developmental regulation of several defence-related genes in tobacco. **EMBO J.** 6:3579–3583.

Milling A, K Smalla, F Maidl, M Schloter, J Munch (2005) Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant Soil** 266:23–39.

Mislivec PB, LR Beuchat, MA Cousin (1992) Yeast and molds. p. 239-249. *In*: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. C Vanderzant, DS Splittoesser (eds.) American Public Health Association, New York.

Nannipieri P, J Ascher, MT Ceccherini, L Landi, G Pietramellara, G Renella (2003) Microbial diversity and soil functions. **Eur J Soil Sci** 54: 655–670.

Nannipieri P, J Ascher, MT Ceccherini, L Landi, G Pietramellara, G Renella, F Valori (2007) Microbial diversity and microbial activity in the rhizophere. **CI. SUELO (ARGENTINA)** 25:89–97.

Nardi S, G Concheri, D Piaaeghello, A Sturaro, R Rella, G Parvoli (2000) Soil organic matter mobilization by root exudates. **Chemosphere** 41:653–658.

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.** 170:265–70.

O'Callaghan M, EM Gerard, NW Waipara, SD Young, TR Glare, PJ Barrell, AJ Conner (2004) Microbial communities of *Solanum tuberosum* and magainin-producing transgenic lines. **Plant Soil** 266:47–56.

Oger P, A Petit, Y Dessaux (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. **Nature Biotech.** 15: 369–372.

Oger P, H Mansouri, Y Dessaux (2000) Effect of crop rotation and soil cover on alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines. **Mol. Ecol.** 9:881–890.

OECD (2003) Considerations for the safety assessment of animal feedstuffs derived from genetically modified plants. (visit on 10/14/2012) http://www.olis.oecd.org./olis/2003doc.nsf/43b b6130e5e86e5fc12569fa005d004c/4502beelcal6c943 c1256d520028e259/ $ FILE/JT00147696. pdf

Rona MG, D Susanne, CC Tebbe (2010) Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of *Bt* maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria. **Euro. J. Soil Biol.** 46:41–48.

Rovira AD (1959) Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. **Plant Soil** 11: 53–64.

SAS Institute, Inc. (2006) SAS/STAT E.G User's Guide. Version 8. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 5136pp.

Shakira G, AA Atiya, G Mudassar, IA Muhammad, B Imrana (2010) Met genomics and its application in soil microbial community studies: Biotechnological prospects. **J. Ani. Plant Sci.** 6:611–622.

Shen RF, H Cai, WH Gong (2006) Transgenic *Bt* cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. **Plant Soil** 285: 149–159.

Smigocki AC, LD Owens (1988) Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:5131–5135.

Smigocki A, JW Neal, JI McCanna, L Douglass (1993) Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. **Plant Mol. Biol.** 23:325–335.

Soon YK, S Abboud (1991) A comparison of some methods for soil organic carbon determination. Commum. **Soil Sci. Plant Anal.** 22:943–954.

Teather RM, PJ Wood (1982) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbial.** 43:777–780.

Ting MY, HD Shih, CY Lin (2008) Increased susceptibility of rice following insertion of amylopullulanase gene, to brown spot caused by *Bipolaris oryzae*. **J. Phytopathol.** 156:530–533.

Warembourg FR, EA Paul (1973) The use of $^{14}CO_2$ canopy techniques for measuring carbon transfer through the plant-soil system. **Plant Soil** 38:331–345.

Weert SD, H Vermerien, IHM Mulders, I Kuiper, N Hendrickx, GV Bloemberg, J Vanderleyden, RD Mot, BJJ Lugtenberg (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 15:1173–1180.

Wei XD, HL Zou, LM Chu, B Liao, CM Ye, CY Lan (2006) Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil. **Plant Soil** 285:347–358.

Werner T, V Motyka, V Laucou, R Smets, H Van Onckelen, T Schmulling (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **Plant Cell** 15:2532–2550.

Williams PH (1980) Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Dis.** 64:736–742**.**

Zhang Y, PR Shewry, H Jones, P Barcelo, PA Lazzeri, NG Halford (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. **Plant** 28:431–441.

－編輯：楊純明